蔬菜殘留農藥之生物檢驗法研究[1]

李 順 連[2]　　王 清 玲[3]

摘 要 本研究係以現行之直接餵食法 (direct feeding method) 與乾膜法 (dry film method) 對家蠅 (*Musca domestica* L.) 及小果蠅 (*Drosophila melanogaster* Meig.) 進行比較試驗。由家蠅及小果蠅對不同處理所得之反應程度，評定其優劣，作爲改進今後蔬菜殘留農藥生物檢驗之重要參考。

供試農藥計有甲基巴拉松、巴拉松、馬拉松、撲滅松、加保利等五種。試驗結果顯示，兩種生物檢驗方法各有其特殊之實用價值。直接餵食法之長處爲操作簡便，但樣本中殘留農藥量若低於可測範圍，或農藥之殘留容許量低於其最低可測範圍，則將無法適用。乾膜法操作手續雖較餵食法複雜，唯樣本中所含之殘留農藥量超過或低於可測範圍時，仍可將抽出液按一般化學分析法予以稀釋或濃縮，使測定濃度調節至最適宜之可測範圍，故其可測範圍較直接餵食法爲大。

近二十餘年來，由於合成殺蟲劑之發明，減輕許多農作物因病蟲害所受之損失，同時亦因此類農藥之大量應用，以及對高等動物之影響，使吾人對殘留於農作物及加工食品中農藥之檢驗，愈加重視。蔬菜在人類生活中不可一日或缺，臺灣地區由於受地理環境以及栽培制度之影響，蔬菜害蟲特別猖獗[1]。又由於菜農常施農藥藉以防止蟲害而保持蔬菜商品價值，故蔬菜中農藥殘留問題較其他作物更爲嚴重。要防止含有過量農藥之蔬菜流入市場，必先建立一種簡易、正確、可行之檢驗方法，以測定蔬菜中之殘留農藥含量情形，如此方可防患未然，進而杜絕其流入市場。在各種檢驗方法中，化學分析法雖較精密確實，但需要昂貴之儀器與繁複之操作過程，以目前我們財力人力而言，很難將此工作擴大推展。生物檢驗 (bioassay) 則較簡單迅速，雖亦有無法做「定性」之缺點，但可測知樣品中全部農藥之毒性 (total toxicity)，在大規模從事「無毒蔬菜」之鑑定上頗具實效[2][8][9]，故在臺灣仍被廣汎採用。

臺灣省農林廳爲防止含有超量農藥殘留之蔬菜流入市場，並教導農民如何在採收限制時期(waiting period) 後收穫蔬菜，自民國五十年起經農復會經費補助與農業試驗所技術支援下，在全省各重要蔬菜產區，設立農藥殘量生物測定站。迄目前爲止，已分別在基隆、宜蘭、臺北、板橋、陽明山、桃園、新竹、苗栗、豐原、臺中、草屯、員林、西螺、永靖、溪湖、嘉義、麻豆、岡山、屏東、臺東、花蓮等地設置二十一個測定站，主要方法採用本所過去確立之家蠅直接餵食法 (direct feeding method) 予以測定。唯此法對部份殘留農藥較不敏感，故本研究擬以現時應用之直接餵食法與乾膜法 (dry film method)，對家蠅 (house fly) 及小果蠅 (drosophila) 做有系統之比較試驗，以兩種昆蟲對不同處理所得之反應程度，評定兩種方法之優劣，作爲改進今後蔬菜殘留農藥生物檢驗之重要參考。試驗進行中亦時以化學分析法 (GLC 法) 作爲相互間結果之對照，以探究生物檢驗法之正確程度。

本研究獲中正科學技術基金會補助。試驗進行中蒙本所應用動物系邱瑞珍主任多方鼓勵，農藥研究室諸同仁協助試驗，文成復蒙恩師臺大陳玉麟教授細心斧正，作者等謹致誠摯之謝忱。

本研究獲中正科學技術研究基金會補助，特誌謝忱。
1.研究報告農試字第七五五號
2.臺灣省農業試驗所技士兼股長
3.研究助理，現在亞洲蔬菜研究發展中心工作

材料與方法

一、試驗昆蟲：

1.家蠅（*Musca domestica* L.） 本品系係本所於十五年前向臺灣省瘧疾研究所分讓保存之品系，據稱其原始係自英國引入之無抗藥性品系（susceptible strain），已在本所農藥研究室連續飼育達100代以上。其幼蟲培養基成份為洋菜（agar）50克、酵母粉1,500克、脫脂奶粉 250 克、防腐劑苯甲酸鈉（Sodium benzoate） 5克、水 6,000ml。成蟲飼以 20 %之奶粉液。飼育條件為溫度 22°～24°C，濕度 R H 80～90%。各期發育日數卵期為1～2日，幼蟲期7～8日，蛹期5～6日，成蟲產卵前期4～5日。

2.小果蠅（*Drosophila melanogaster* Meig） 此品系係由中央研究院動物研究所林飛棧先生所贈送。幼蟲與成蟲均飼育在內徑 5cm 高 9cm 之玻璃瓶，放置於 28°C 恆溫箱內。幼蟲培養基配方為洋菜20克、香蕉300克、酵母粉50克、紅糖25克、防腐劑苯甲酸鈉4克、酒精 4 ml。

二、供試農藥

甲基巴拉松（methyl parathion）、巴拉松（parathion）、馬拉松（malathion）、撲滅松（sumithion）、加保利（carbaryl）等。

三、試驗蔬菜

小白菜（*Brassica pekinensis* Rupr.）及甘藍菜（*Brassica oleracae* L. *var. capitata* D. C.）

四、試驗步驟：

1. 生物檢驗法

（1）直接餵食法 標準組：將無噴藥蔬菜樣本打碎，取23.5克，加入已知濃度之農藥丙酮溶液0.5ml，添入其嗜好物（糖漿或砂糖）1克，予以均勻混合，平均放入三個內徑 5cm 高 9cm 之玻璃瓶底，然後將羽化三日之家蠅或羽化二日之小果蠅各20隻放入，在 28°C 定溫箱內放置四小時，計數其死亡率。 供試組：將欲測定蔬菜樣本打碎，取一定量，添入蠅類嗜好物後均勻混合，然後按標準組相同方法放入供試昆蟲，經四小時後計數其死亡率。 對照組：以標準菜（無噴藥蔬菜）設置空白對照組，以測定試驗蔬菜成份對供試昆蟲之反應，或該批昆蟲之自然死亡率。如對照組發生死亡情形，供試組應依 Abbott 氏公式校正其死亡率[4]。

（2）乾膜法 標準組：以苯(Benzene)為溶劑，將供試農藥標準劑或原體，調配成試驗所需濃度，以吸管吸取，滴入內徑 5cm 高 9cm（家蠅用）或內徑 3cm 高 15cm （小果蠅用）之玻璃瓶內，每瓶滴入 1ml，在室溫下移置振盪器上，搖盪至苯全部蒸散風乾為止，然後將三日生家蠅或二日生小果蠅各20隻放入，瓶口以衛生紙蓋住，置於 28°C 定溫箱內，四小時後檢查其死亡率。 供試組：將欲檢驗蔬菜樣本打碎，用苯抽出，將抽出液按 GLC 分析方法準備步驟予以淨化（clean up）（在後另敍）。淨化後之抽出液，照標準組同樣方法各滴 1 ml 於玻璃瓶底，待苯風乾後移試驗昆蟲 20 隻於瓶內，瓶口以衛生紙蓋住，置於 28°C 定溫箱內，四小時後檢查其死亡率。

以上試驗，每類藥劑對每一方法均有三重複處理，連續試驗4～5次，求其平均值，供作繪製檢定線之數據。

（3）檢定線之製定

由兩種生物檢驗方法在各組農藥標準組所得結果，依藥量為對數，死亡率為機值（Probit）之直線關係，在機值對數紙上繪製其迴歸直線（Ld—p line）[5][6][7]，作為其反應檢定線（calibration curve）。

（4）殘量檢定

不同農藥在不同試驗方法中之檢定直線既已製定，則其檢驗樣本即可按前述方法，放入供試昆蟲

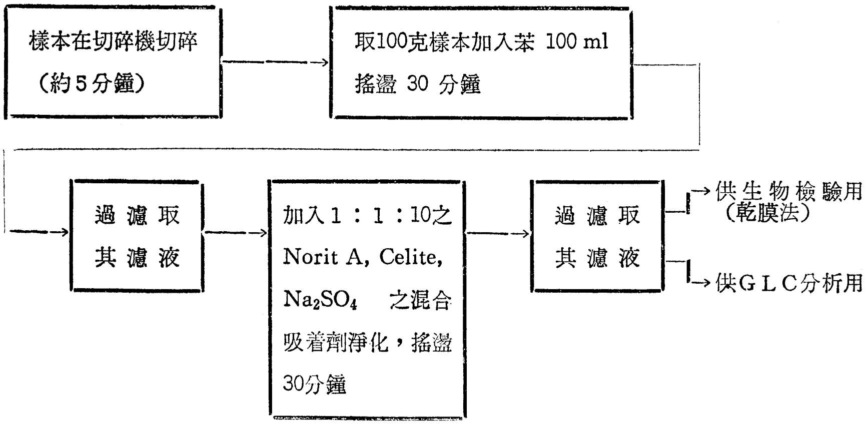
予以測定，經四小時後，由其死亡率推算樣本中所含殘留農藥量。

2.化學分析法

化學分析法採用氣相層次分析法（gas-chromatographic method 簡稱 GLC 法）。此試驗主要目的在相互查對生物檢驗方法與化學分析方法之測定結果。此外由於乾膜法試驗中需要除去蔬菜抽出液中可能干擾生物檢驗效果之成份，必需行淨化處理，故 GLC 法淨化後之樣本抽出液，即可分出一部份供做乾膜法生物檢驗之用，達到相互比較之目的。

所用氣相層次分析儀（gas-chromatograph）爲美國 Varian 公司出品之 Aerograph 680，檢定器（detector）爲 ECD。操作條件 Column 溫度爲 180°C, 氮氣流速爲 22.5 秒／10ml. Attenuation 爲32。

蔬菜樣本抽出液按金澤氏抽出淨化法[3]加以改進，其處理過程如下：



結果與討論

本研究曾以甲基巴拉松、巴拉松、撲滅松、馬拉松等四種有機磷劑及加保利等氨基甲酸鹽劑爲標準劑，利用家蠅及小果蠅爲試驗昆蟲，做餵食法與乾膜法之反應試驗，並根據藥量爲對數，死亡率爲機值之直線關係繪製各自之檢定直線，如圖 1 至圖 4。就中加保利對家蠅及小果蠅在乾膜法中每一瓶底藥量提高至 1000r 或餵食法中殘留量達 500ppm，接觸四小時，均不引起死亡，故從實用觀點觀之，兩種生物檢驗法皆不適宜於加保利之殘量測定。

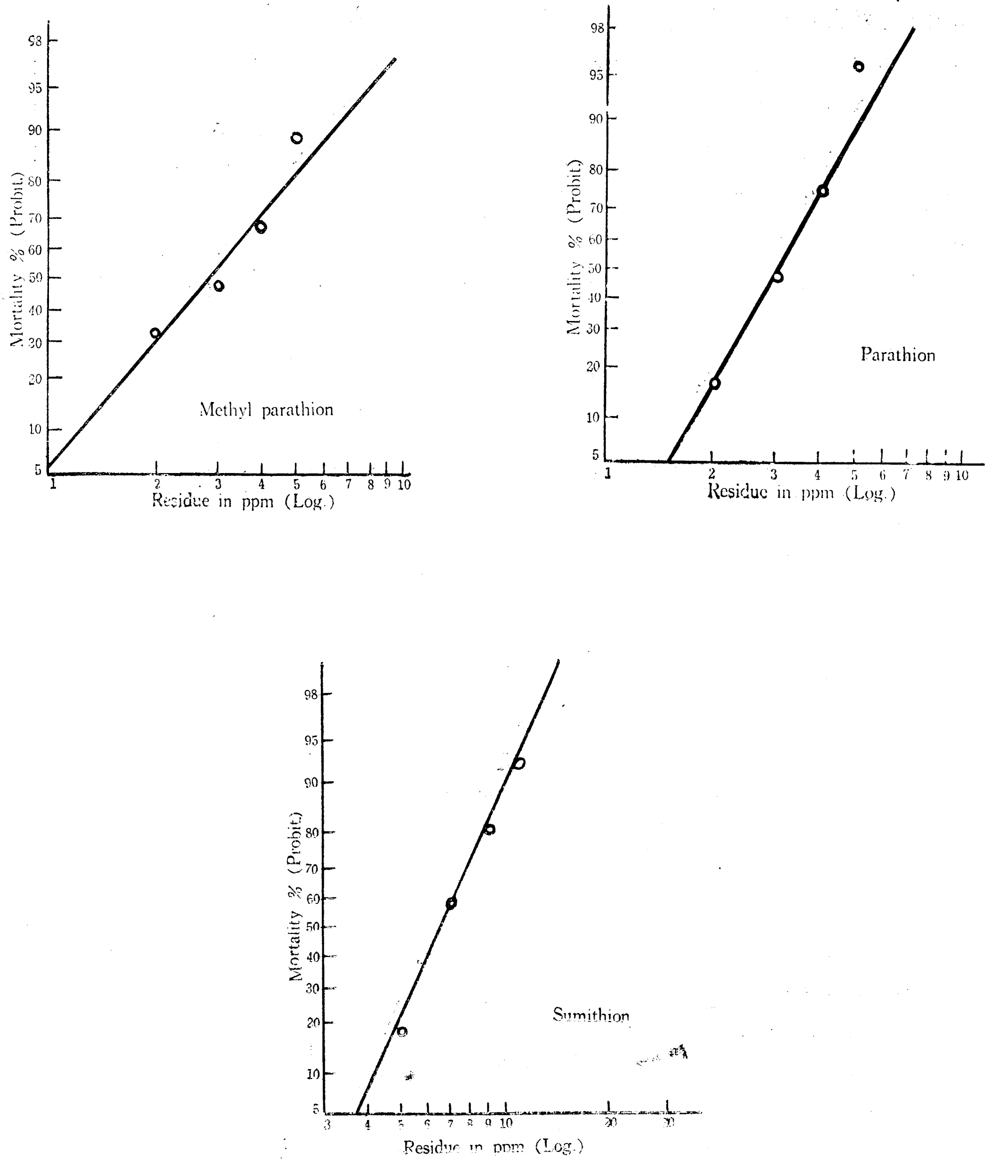


圖 1. 餵食法中家蠅對各種農藥之反應檢定線

Fig. 1. Ld-p Iines for various insecticides on house fly using feeding method.

茲就各類藥劑之檢定直線觀之，小果蠅顯較家蠅對上述藥劑敏感。換言之，小果蠅對蔬菜中殘留農藥之可測量較家蠅爲低，如表一所示，小果蠅對巴拉松之最低最高有效測定範圍，乾膜法爲0.25～0.7r/jar，家蠅則爲 1.15～2.95r/iar。餵食法中小果蠅爲 0.45～1.45 ppm，家蠅則爲 2.2～4.1ppm。其他如甲基巴拉松、馬拉松、撲滅松等，都具有相同之趨向，故小果蠅適合於較微量之殘量測定。

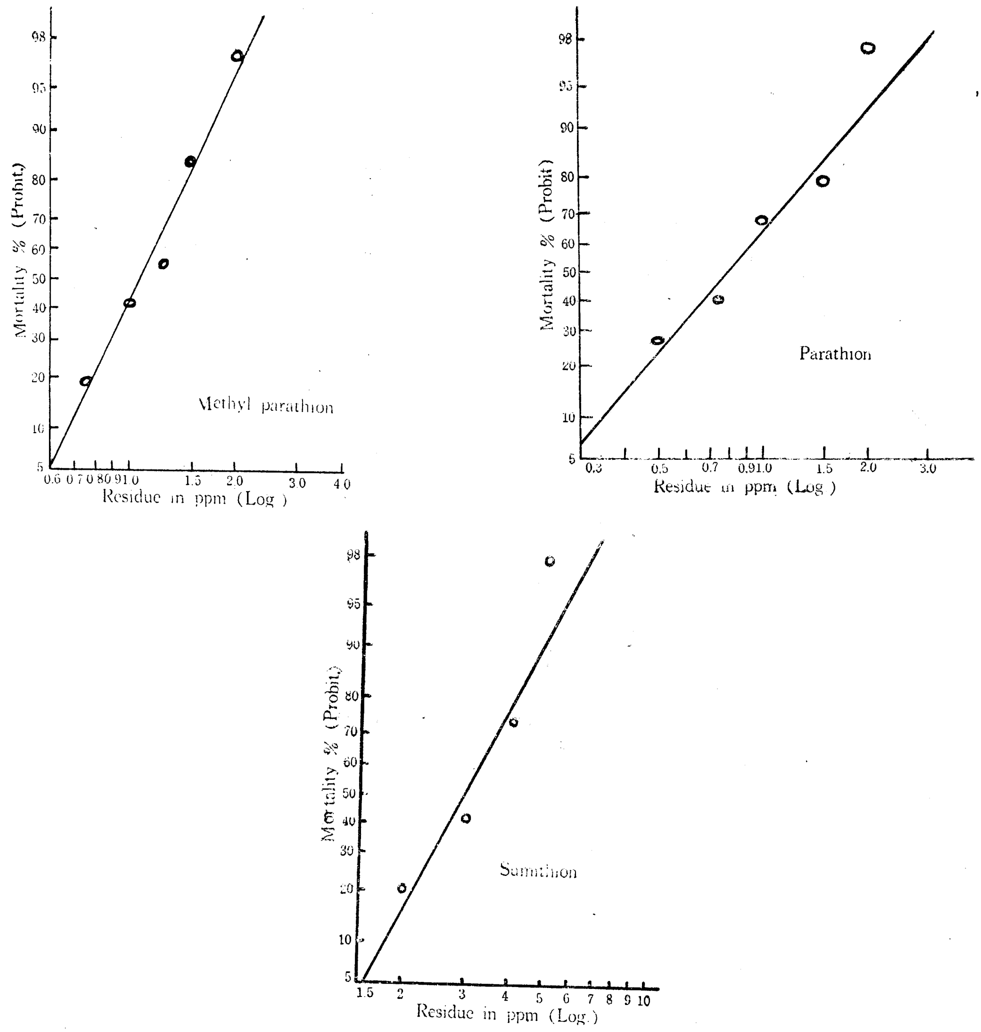
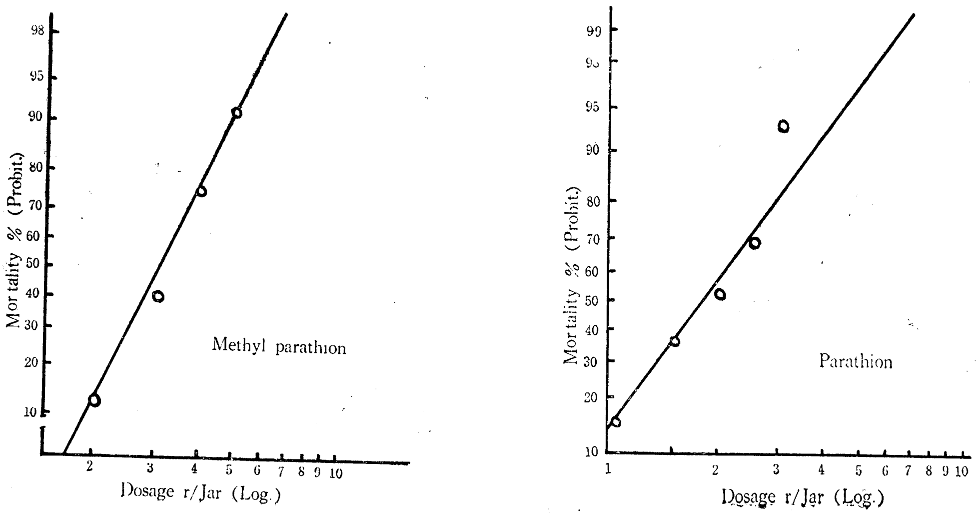


圖 2. 餵食法中小果蠅對各種農藥之反應檢定線

Fig. 2. Ld-p lines for various insecticides on drosophila using feeding method.



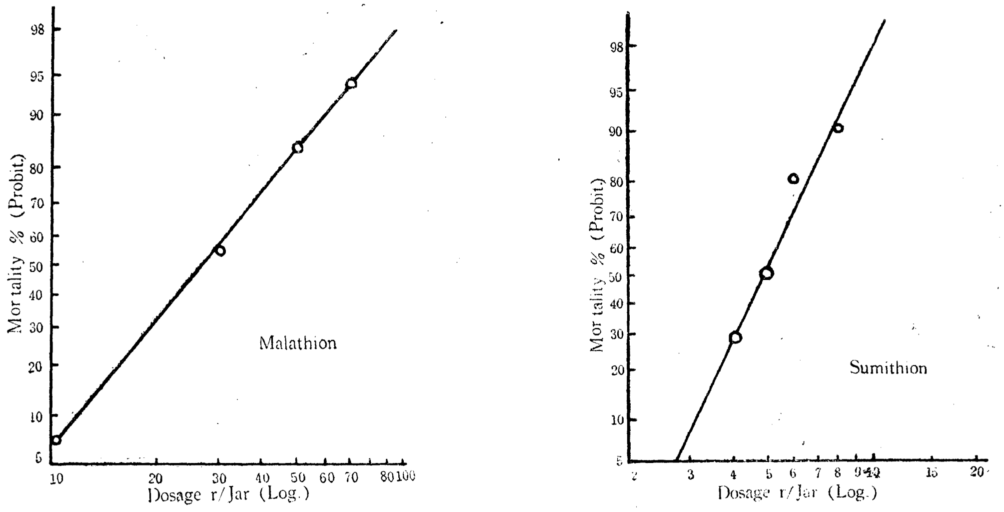
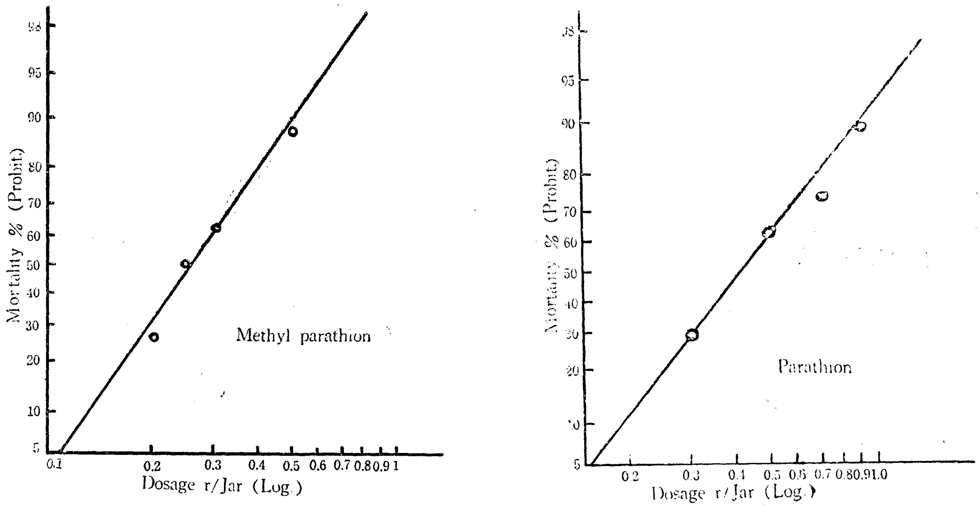
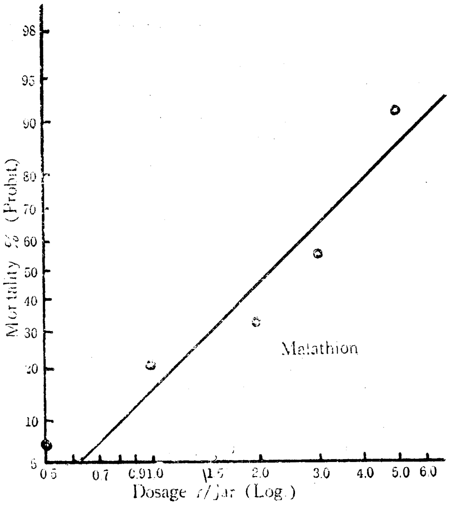


圖 3. 乾膜法中家蠅對各種農藥之反應檢定線

Fig. 3 Ld-p lines for various insecticides on house fly using dry film method.





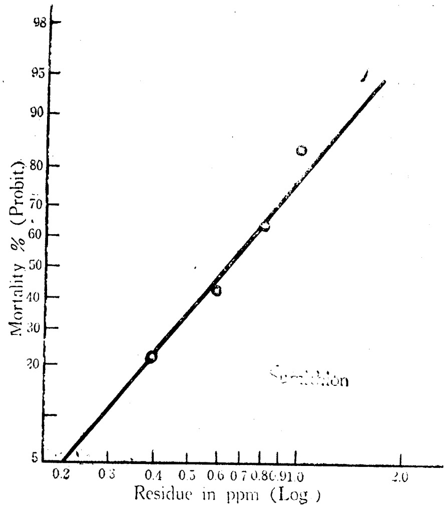


圖 4. 乾膜法中小果蠅對各種農藥之反應檢定線

Fig. 4. Ld-p lines for various insecticides on drosophila using dry film method.

表一、兩種生物檢驗用昆蟲之有效測定範圍

Table 1. The effective detectable range of two bioassay methods tested by house fly and drosophila

農藥名稱 insecticides	供試昆蟲 test insect	直接餵食法 direct feeding method		乾膜法 dry film method	
		最低有效測定界限 lowest detectable range ppm	最高有效測定界限 highest detectable range ppm	最低有效測定界限 lowest detectable range ppm	最高有效測定界限 highest detectable range ppm
巴拉松 Parathion	小果蠅 drosophila	0.45	1.45	0.25	0.7
	家蠅 house fly	2.20	4.10	1.15	2.95
甲基巴拉松 methyl parathion	小果蠅 drosophila	0.78	1.54	0.16	0.40
	家蠅 house fly	2.2	4.5	2.30	4.20
撲滅松 sumithion	小果蠅 drosophila	2.0	4.40	0.37	1.05
	家蠅 house fly	5.0	9.0	3.60	6.60
馬拉松 malathion	小果蠅 drosophila	0.55	2.10	—	—
	家蠅 house fly	15.40	44.0	—	—

由最低最高之有效測定範圍比較，乾膜法與餵食法對家蠅之可測範圍，兩者差異不大。例如家蠅對巴拉松、甲基巴拉松、撲滅松等殘量，在餵食法與乾膜法測定時，其感應度頗爲接近；但小果蠅在兩種方法中之反應，則乾膜法較餵食法敏感，因此選用不同之試驗昆蟲，其可測範圍將隨之改變。

爲進一步驗證蔬菜農藥殘量之生物檢驗法與化學分析法之準確性，曾就同一蔬菜樣本做 GLC 法、乾膜法及餵食法等三種不同方法之比較試驗。在每一 2 ×10m小區之小白菜園中，噴撒47%巴拉松乳劑1,000倍（低濃度）及500倍（高濃度）在施藥三日及五日後取樣分析，結果列於表二。

表二、生物檢驗法與氣相層次分析法對小白菜中殘留巴拉松農藥之測定比較

Table 2. Comparison of bioassay and gas-chromatographic method for determination of Parathion residue in Chinese cabbage

樣本代號 sample Code	生物檢驗法 bioassay								氣相層次分析法 gas-chromatographic analysis ppm
	直接餵食法 direct feeding method				乾膜法 dry film method				
	小果蠅 drosophila		家蠅 house fly		小果蠅 drosophila		家蠅 house fly		
	死亡率 mortality %	相當殘量 residae ppm	死亡率 mortality %	相當殘量 residue ppm	死亡率 mortality %	相當殘量 residue ppm	死亡率 mortality %	相當殘量 residue ppm	
EP—L—3D	72	1.20	5	1.58	95	>1.0	7	0.92	1.05
EP—H—3D	95	2.50	24	2.30	100	>1.0	52	1.85	1.97
EP—L—5D	50	0.80	2	1.40	80	0.70	5	0.70	0.73
EP—H—5D	90	1.89	8	1.70	97	>1.0	12	1.10	1.26

由表二看來，兩種生物檢定法與 GLC 法測定數值，雖互有差異，但差異並不很大。氣相層次分析儀爲目前農藥殘量分析中最正確精密之儀器，且靈敏度高，又可做定性分析之工具，加以生物檢驗法受各種因子之影響很大，其精確度與敏感度，前者自然較後者優異。但若測定精確度要求不嚴（誤差10～20%間），供試昆蟲能完全標準化，且在操作過程中又能嚴格控制各種人爲誤差，在大規模蔬菜農藥殘量鑑定上，生物檢驗仍具有相當實用價值。

結　　語

根據以上之試驗結果觀之，兩種生物檢驗方法各有其特殊之實用價值。直接餵食法之長處爲操作簡便，樣本取來打碎後即可接蟲測定。但若遇到低於可測範圍內之殘量樣本，即無法直接加以測定，例如農藥之殘留容許量（tolerance）若低於其最低可測範圍，則直接餵食法即無法加以應用。乾膜法之操作手續較餵食法複雜，因須對其樣本抽出液加以淨化。但乾膜法在樣本所含殘量超過或低於可測範圍時，可將抽出液按一般化學分析法予以稀釋或濃縮，以調節測定濃度至最適宜之可測範圍，增加測定效果，因此其可測範圍無形中較餵食法爲大。

至於試驗昆蟲之選用，家蠅及小果蠅在蔬菜農藥殘量生物檢驗上都頗爲適宜，因其飼育容易，生活史不長，不必花費過多經費即可大量繁殖。此外兩種昆蟲對上述農藥，都具有特定之可測範圍，因此殘留容許量較低之農藥，可選用小果蠅試驗，容許量高之農藥則選用家蠅試驗，或者兩者同時應用，如此低於家蠅可測範圍以外之殘留量，即可藉小果蠅之測定而獲知其含量。

總之，生物檢驗中之直接餵食法與乾膜法各有其優劣，選擇何種方法端視試驗室之設備及測定蔬菜農藥之對象而定。但若能以兩種供試昆蟲，配合兩種生物檢定方法相互應用，則對蔬菜殘留農藥之測定，將可獲致更正確之效果。

參 考 文 獻

1. 陶家駒・1973・臺灣蔬菜害蟲七年來研究成果彙報及檢討・科學農業21 (7,8)
2. 菅原寛夫、古山清・1965・農薬の生物檢定法・日本南江堂・
3. 金澤純・1969・農作物の殘留農藥分析法・衛生化學15 (2)
4. Abbott, W. S., 1929, A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. ; 18 : 265—267
5. Bliss, C. I., 1935, The calculation of dosage-mortality curve. Ann. Appl. Biol ; 22 (2)
6. Finney, D. J., 1952, Probit analysis, a statistical treatment of the sigmoid response curve. Ind. Ed ; Cambridge Univ. Press, Cambridge, England.
7. Hoskins, W. M. and R. Craig, 1962, Use of bioassay in entomology. Ann. Rev. Entomol., 7 : 437—464
8. Rujicka, J. H., 1973, Methods and problems in analysing for pesticide residues in the environment. In "Environmental pollution by pesticides". Plenum Press, London
9. Sun, Y. P., 1957, Bioassay of pesticide residues. In "Advances in pest control research". Vol. 1 : 449—495. Interscience.

STUDIES ON THE BIOASSAY OF INSECTICIDE RESIDUES ON/IN VEGETABLES[1]

by Sung-lien Lee[2] and Chin-ling Wang[3]

Summary

In order to improve the current bioassay of insecticide residues on/in vegetables, the comparative studies of direct feeding method and dry film method tested by house fly (*Musca domestica* L.) and drosophila (*Drosophila melanogaster* Meig.) have been investigated.

Five insecticides, such as methyl parathion, parathion, malathion, sumithion, and car baryl, were tested in the experiment. The result has shown that two bioassay methods displayed their own specific practical value. The main advantage of direct feeing method is its simple application. However, if the amount of insecticide residues in sample vegetable is lower than its detectable range, the feeding method will not be able to apply. The detectable range of dry film method seems to be wider than that of feeding method. Since when the sample residue is above or below its detectable range, the sample extract can be diluted or concentrated with general analytical process to suitable concentration and increased its practical value.

Acknowledgement is made for the support of this research by Chung Cheng Science and Technology Research Foundation.

1. Research report serial No. 755 of The Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Associate entomologist, Department of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute.
3. Former research assistant. Present address : The Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Tainan, Taiwan.